

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-149066

(43)Date of publication of application : 05.06.2001

(51)Int.CI.

C12N 1/20  
A01N 63/00  
A01N 63/02  
C12N 3/00  
//(C12N 1/20  
C12R 1:07 )

(21)Application number : 11-338628 (71)Applicant : CHIBA PREFECTURE  
DAINIPPON INK &  
CHEM INC

(22)Date of filing : 29.11.1999 (72)Inventor : KIMURA MASATOSHI  
EBARA TAKESHI  
NISHIBASHI  
HIDEJI  
FUJIE AZUSA  
HASEGAWA MAKOTO  
TANAKA MASAO  
YOKOYAMA TOMOKO

## (54) METHOD FOR PRODUCING SPORANGIUM OF BACILLUS POPILLIAE

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an industrial method for producing a sporangium of *Bacillus popilliae*, capable of affording a large amount of sporangium of *Bacillus popilliae* containing a spore and a parasporal body by using an artificial medium not using insects of the family Scarabaeidae, to obtain an excellent controller for insects of the family Scarabaeidae, greatly damaging roots of lawn grass, agricultural and horticultural crops, trees, etc., comprising the sporangium as an active ingredient and to provide a method for controlling insects of the family Scarabaeidae.

SOLUTION: This method for producing the sporangium of *Bacillus popilliae* containing a spore and a parasporal body is characterized in that a bacterium belonging to *Bacillus popilliae* is cultured in a medium containing 0.01 wt.% to 0.5 wt.% of activated carbon. This controller against insects of the family Scarabaeidae comprises the sporangium as an active ingredient. The method for controlling insects of the family Scarabaeidae uses the sporangium.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-149066

(P2001-149066A) /

(43) 公開日 平成13年6月5日 (2001.6.5)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	A 4 B 0 6 5
A 0 1 N 63/00		A 0 1 N 63/00	E 4 H 0 1 1
63/02		63/02	F
C 1 2 N 3/00		C 1 2 N 3/00	E

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-338628	(71) 出願人	591014710 千葉県 千葉県千葉市中央区市場町1番1号
(22) 出願日	平成11年11月29日 (1999. 11. 29)	(71) 出願人	000002886 大日本インキ化学工業株式会社 東京都板橋区坂下3丁目35番58号
		(72) 発明者	木村 雅敏 千葉県市原市ちはら台3-32-1-1-10-502
		(72) 発明者	江原 岳 千葉県佐倉市大崎台3-4-5-3-104
		(74) 代理人	100088764 弁理士 高橋 勝利

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バチルス・ポピリエの胞子囊の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明が解決しようとする課題は、コガネムシ科昆虫を用いない人工培地を用いて、胞子とパラスポラルポディとを含む多量のバチルス・ポピリエの胞子囊を得るバチルス・ポピリエ胞子囊の工業的な製造方法、該胞子囊を有効成分とする、芝や農園芸作物や樹木等の根に多大な被害を与えるコガネムシ科昆虫の優れた防除剤、及び防除方法を提供することができる。

【解決手段】 バチルス・ポピリエに属する菌を活性炭0.01重量%~0.5重量%を含む培地で培養することを特徴とする、胞子とパラスポラルポディとを含むバチルス・ポピリエの胞子囊の製造方法、該胞子囊を有効成分とするコガネムシ科昆虫の防除剤、及び該胞子囊を用いるコガネムシ科昆虫の防除方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 バチルス・ポピリエに属する菌を活性炭0.01重量%~0.5重量%を含む培地で培養することを特徴とする、孢子とパラスポラルボディを含むバチルス・ポピリエの孢子囊の製造方法。

【請求項2】 式1の孢子囊化率で示される、孢子囊数の全菌数当たりの割合が0.1%以上であることを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

(式1)

孢子囊化率(%) = (孢子囊数) / (全菌数) × 100

【請求項3】 培地中に含まれるグルコース濃度が0.01重量%以下であることを特徴とする請求項1又は2に記載の製造方法。

【請求項4】 孢子とパラスポラルボディを含む孢子囊がコガネムシ科の昆虫に対して殺虫性を有することを特徴とする請求項1~3の何れか1つに記載の製造方法。

【請求項5】 コガネムシ科の昆虫がドウガネブイブイである請求項4に記載の製造方法。

【請求項6】 培養が、固体培養である請求項1~5の何れか1つに記載の製造方法。

【請求項7】 培地中に、寒天、ポリペプトン、酵母エキス及びリン酸塩を含むことを特徴とする請求項6に記載の製造方法。

【請求項8】 バチルス・ポピリエに属する菌が、バチルス・ポピリエ・セマダラ(FERM P-16818)である請求項1~7の何れか1つに記載の製造方法。

【請求項9】 請求項1~8の何れか1つに記載の製造方法により製造された、孢子とパラスポラルボディを含むバチルス・ポピリエの孢子囊を有効成分とするコガネムシ科昆虫の防除剤。

【請求項10】 請求項1~8の何れか1つに記載の製造方法により製造された孢子とパラスポラルボディを含むバチルス・ポピリエの孢子囊をコガネムシ科昆虫に作用させるコガネムシ科昆虫の防除方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、バチルス・ポピリエに属する菌の人工培地での培養による孢子とパラスポラルボディを含むバチルス・ポピリエの孢子囊の製造方法と、該孢子囊を有効成分とするコガネムシ科昆虫の防除剤、及びコガネムシ科昆虫の防除方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 コガネムシ科昆虫の幼虫は、芝や農園芸作物や樹木等の広範囲な植物の根を食餌し、それらに多大の被害を与える。これらの幼虫は地中に棲息することから、地上から散布する化学農薬が効きにくく、且つその棲息場所が特定しにくいことから、十分な殺虫効果を得る為には、広範囲に、多量の殺虫性農薬を散布して地

中に浸透させる必要があり、その結果、環境汚染を引き起こし易い為、事実上、その防除、駆除は殆ど困難であった。

【0003】 一方、バチルス・ポピリエに属する菌は、これらコガネムシ科昆虫の幼虫に寄生して乳化病を発病させ、最終的にコガネムシ科昆虫を死に至らしめることから、化学農薬が効きにくいコガネムシ科昆虫の駆除にバチルス・ポピリエに属する菌を利用しようとする試みが古くから行われてきた。

【0004】 また、バチルス・ポピリエに属する菌の培養方法としては、寄生宿主であるコガネムシ科の生きた幼虫を用いて菌を増殖させ孢子囊を製造する方法が従来から知られていた。

【0005】 即ち、バチルス・ポピリエの孢子囊をコガネムシ科昆虫の幼虫の存在する飼育培土に散布して、バチルス・ポピリエの孢子囊を経口的にコガネムシ科昆虫の幼虫に摂取させるか、又は体液中に注射により注入した後、幼虫を3週間~4週間飼育し、該幼虫体内でバチルス・ポピリエを増殖させ、その後、幼虫に孔を開けるか切開して体液を採取し、得られた体液を遠心分離又は濾過することにより、幼虫体内で増やした孢子囊を得る方法である。

【0006】 しかしながら、この方法では、コガネムシ科昆虫の幼虫を大量に飼育する必要があり、結果的に大量の孢子囊を多量に、短時間に、且つ経済的に得ることは困難であった。この為、コガネムシ科昆虫の幼虫を用いない人工培地を用いての培養方法に関する多くの研究が行われてきた。

【0007】 これらのコガネムシ科昆虫の幼虫を用いない人工培地での培養方法（以下、昆虫体外培養法と呼ぶことがある）としては固体培養と液体培養がある。固体培養ではFOSTER等（J. W. Foster et al., 1950年, J. Bacteriol., 59巻, 463-470頁）、STEINKRAUS（Keith H. Steinkraus, 1957年, J. Bacteriol., 74巻, 625-632頁）の研究例が、液体培養では、HAYNES等（W. C. Haynes et al., Journal of Bacteriology, June, 1966年, 91巻, No6, 2270-2274頁）の研究例がある。しかし、いずれの場合も、得られた孢子あるいは孢子囊のコガネムシ科昆虫の幼虫に対する殺虫効果は明記されておらず、また商業生産にも繋がっていない。

【0008】 米国特許（USP No. 4824671）は人工培地を用いた液体培養によりバチルス・ポピリエに属する菌を培養している例である。しかし得られた孢子囊に孢子は有るが、パラスポラルボディは存在せず、幼虫体内で形成された孢子囊に比較してコガネムシ科昆虫の幼虫に対する殺虫効果は弱い。また福原も人工培地から得た孢子囊では感染が起こらないと報告している（福原俊彦著 昆虫病理学 57頁）。

【0009】 孢子囊とは、図1に示す模式図の如く、孢子とパラスポラルボディ（又は副孢子小体）と呼ばれる

小体を含む嚢であり、バチルス・ポピリエに属する菌が産生する。バチルス・ポピリエの人工培地を用いた培養方法に関する従来の文献では、孢子嚢と孢子とが明確な区別なく用いられている場合が多く、文献中の孢子との言葉が孢子のみを意味するのか、孢子は含むがバラスポラルポディは含まない孢子嚢を意味するのか、又は孢子とバラスポラルポディとを含む孢子嚢であるのかが不明である場合が多い。

【0010】従って、従来の文献に記載されている人工培地での培養方法で得られたバチルス・ポピリエの孢子が、孢子とバラスポラルポディを含む孢子嚢であるのかは不明であり、更に該孢子もしくは孢子嚢のコガネムシ科昆虫の幼虫に対する殺虫効果も明らかにされていないが、後述する理由から、それらの多くは孢子とバラスポラルポディとを含む孢子嚢ではなく、孢子のみ又は孢子のみを含む孢子嚢であり、且つそのコガネムシ科昆虫に対する殺虫効果は弱いと推定された。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、コガネムシ科昆虫の幼虫を用いず、人工培地を用いて孢子とバラスポラルポディとを含む多量のバチルス・ポピリエの孢子嚢を得るバチルス・ポピリエ孢子嚢の工業的な製造方法、該孢子嚢を有効成分とする、芝や農園芸作物や樹木等の根に多大な被害を与えるコガネムシ科昆虫の優れた防除剤、及び防除方法を提供することである。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、コガネムシ科昆虫の効果的な殺虫防除には、バチルス・ポピリエの孢子のみでなく、孢子とバラスポラルポディとを含む孢子嚢が必要であることを見出した。更に、バチルス・ポピリエ菌をコガネムシ科昆虫の幼虫体外で増殖させ、且つ孢子とバラスポラルポディとを含む孢子嚢を形成させる為には、該菌の増殖に伴って菌体外に排出される孢子嚢形成を阻害する代謝産物を除去する必要があること、また該阻害代謝産物を除去する際に、孢子嚢の形成に必要な成分までを除去しない必要があることを見出した。

【0013】従来の報告例においても、バチルス・ポピリエの人工培地での培養では、菌の生育の為に培養阻害物質を除去することが必要であり、活性炭や可溶性デンプン等の吸着剤を人工培地に添加している例が見られた。しかしながら、本発明者らは、阻害物質の除去材であるこれらの活性炭の添加量を制限して培養を行わねば、孢子とバラスポラルポディとを含む孢子嚢が形成されないことを見出した。

【0014】即ち、本発明者らは、バチルス・ポピリエの人工培地への活性炭の添加量が0.5重量%を越えると、孢子嚢を形成するのに必要な栄養分までも除去してしまう為か、孢子とバラスポラルポディとを含む孢子嚢

形成が急激に減少することを見出した。一方、従来報告されている阻害物質吸着剤の添加量は、培地に対していずれも0.6重量%以上であり、且つコガネムシ科昆虫の殺虫効果を発揮する孢子又は孢子嚢の形成程度は報告されていなかった。

【0015】本発明者らは、従来報告された0.6重量%以上の活性炭を含む人工培地での培養では、菌（栄養細胞）自体の生育は良好であるものの、孢子とバラスポラルポディとを含む孢子嚢の生産量は極めて少なく、コガネムシ科昆虫の殺虫効果を発揮するのに十分な孢子とバラスポラルポディとを含む孢子嚢が得られないこと、更に人工培地中にグルコースを一定量以上含有している場合には、更に孢子嚢を得にくいことも併せて見いだした。

【0016】従って、従来報告された活性炭を含有する人工培地でのバチルス・ポピリエの培養では、孢子とバラスポラルポディとを含む孢子嚢が十分に得られず、明確なコガネムシ科昆虫の幼虫の殺虫効果が確認できなかった為に、その殺虫効果の報告がなかったものと推定される。

【0017】これらから本発明者らは人工培地中の活性炭量及びグルコース量を制限することにより、コガネムシ科に属する昆虫に対して殺虫性を有する孢子とバラスポラルポディとを含む多数の孢子嚢を有するバチルス・ポピリエの培養方法及び、該培養方法によって得られる孢子嚢を有効成分とするコガネムシ科昆虫の防除剤を完成するに至った。

【0018】即ち、本発明は、(1)バチルス・ポピリエに属する菌を活性炭0.01重量%~0.5重量%を含む培地で培養することを特徴とする、孢子とバラスポラルポディとを含むバチルス・ポピリエの孢子嚢の製造方法と、

【0019】(2)式1の孢子嚢化率で示される、孢子嚢数の全菌数当たりの割合が0.1%以上であることを特徴とする(1)に記載の製造方法と、

【0020】

【式1】

孢子嚢化率(%) = (孢子嚢数) / (全菌数) × 100

【0021】(3)培地中に含まれるグルコース濃度が0.01重量%以下であることを特徴とする(1)又は(2)に記載の製造方法と、(4)孢子とバラスポラルポディとを含む孢子嚢がコガネムシ科の昆虫に対して殺虫性を有することを特徴とする(1)~(3)の何れか1つに記載の製造方法と、

【0022】(5)コガネムシ科の昆虫がドウガネブイブイである(4)に記載の製造方法と、(6)培養が固体培養である(1)~(5)の何れか1つに記載の製造方法と、

【0023】(7)培地中に、寒天、ポリペプトン、酵母エキス及びリン酸塩を含むことを特徴とする(6)に

記載の製造方法と、(8) バチルス・ポピリエに属する菌がバチルス・ポピリエ・セマダラ (FERM P-16818) である(1)～(7)の何れか1つに記載の製造方法と、

【0024】(9) 上記の(1)～(8)の何れか1つに記載の製造方法により製造された、孢子とバラスポラルポディとを含むバチルス・ポピリエの孢子嚢を有効成分とするコガネムシ科昆虫の防除剤と、

【0025】(10) 上記の(1)～(8)の何れか1つに記載の製造方法により製造された孢子とバラスポラルポディとを含むバチルス・ポピリエの孢子嚢をコガネムシ科昆虫に作用させるコガネムシ科昆虫の防除方法とを含むものである。

#### 【0026】

【発明の実施の形態】本発明で用いられるバチルス・ポピリエに属する菌とは、バチルス属ポピリエ種 (*Bacillus popilliae*) に属する菌である。バチルス属ポピリエ種の細菌学的性質は、バージェイズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) によれば、形態的性質は長さが1.3～5.2  $\mu\text{m}$ 、幅が0.5～0.8  $\mu\text{m}$ のグラム陰性桿菌、生育温度は20～35℃で孢子嚢の中にバラスポラルポディを持っている。

【0027】バチルス属ポピリエ種 (*Bacillus popilliae*) に属する菌には、バチルス・ポピリエ・セマダラ株 (*Bacillus popilliae semadara*) (平成10年5月21日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM P-16818として寄託されている)、バチルス・ポピリエ・デュトキ株 (*Bacillus popilliae dutky*) (American Type Culture Collection No. 14706、以下ATCC 14706と称す)、バチルス・ポピリエ・メロロンサ (*Bacillus popilliae melolontha*) 等が挙げられる。

【0028】以下に本発明によるバチルス・ポピリエ孢子嚢の製造方法について述べる。該微生物の培養方法としては通常の固体培養で行うことができる。固体培養の基材としては寒天・ジェランガム・カードラン・キサンタンガム等の多糖類が使用できるが、寒天を用いた培養が特に好ましい。

【0029】一般に微生物の良好な増殖を促すには培地中に糖類などの炭素源が加えられる。本発明に用いるバチルス・ポピリエに属する菌も、グルコース等の糖源を添加することにより菌体の増殖が促進される。しかしながら孢子とバラスポラルポディとを含む孢子嚢を形成させるためには、グルコースの添加は好ましくなく、培地中に含まれるグルコース濃度は0.01重量%以下にすることが好ましい。

【0030】培地に用いる窒素源としてはポリペプトン、乾燥酵母エキス等の有機性窒素が使用できる。これらの濃度は0.1重量%～3.0重量%、好ましくは

0.25重量%～1.5重量%の範囲である。それらの窒素源には、しばしばグルコースが含まれている場合があるが、培地中のグルコース濃度が0.01重量%を越えないように、窒素源を選択し使用することが好ましい。

【0031】培地に用いるリン酸塩としては、リン酸カリウム、リン酸水素二カリウム等のリン酸塩又はそのナトリウム塩等の無機塩が使用できる。これらの濃度は0.05重量%～1.0重量%の範囲で用いることが望ましい。固体培地とするために加えられる寒天、ジェランガム等の多糖類の濃度は0.5重量%～5.0重量%、好ましくは1.0重量%～3.0重量%である。

【0032】培地中には活性炭が添加されるが、添加される活性炭の種類は粉末状、粒状、シート状等のいかなる種類の活性炭でもよく、特に制限はないが、粉末状の活性炭が好ましい。培地中の活性炭濃度は、本発明の重要な要件の一つであり、0.01重量%～0.5重量%である必要がある。培地中の活性炭濃度が0.01重量%以下では、孢子とバラスポラルポディとを含む孢子嚢の形成を阻害する物質の除去効果が十分でなく、また0.5重量%を越えると、孢子とバラスポラルポディとを含む孢子嚢の形成が急激に減少する。

【0033】活性炭の添加方法としては殺菌前の培地中に添加しても良いし、殺菌後の培地に添加しても良いが、活性炭が十分に殺菌され他の微生物に汚染されていないことが必要である。培養温度は25℃～35℃、好ましくは27℃～30℃である。培養時間は培養温度によって異なるが、27℃～30℃の場合で通常10～15日である。

【0034】培養終了後、培養物から孢子嚢を取得する方法としては、孢子嚢を含んだ菌体が固体培養基の表面にあることから、水あるいはリン酸緩衝液、Tris-HCl等の緩衝液を用いて菌体及び孢子嚢を懸濁させて洗い流し、その後、遠心分離や濾過等の一般の分離方法で菌体及び孢子嚢を取得する。

【0035】0.6重量%以上の活性炭を含有する従来の人工培地での培養では、孢子とバラスポラルポディとを含むバチルス・ポピリエの孢子嚢は殆ど得られず、式1の孢子嚢化率で示される、全菌数当たりの孢子嚢数の割合は、通常0.05重量%未満である。

#### 【0036】

##### 【式1】

孢子嚢化率(%) = (孢子嚢数) / (全菌数) × 100

【0037】これに対して、本発明のバチルス・ポピリエの孢子嚢の製造方法により得られる孢子嚢数は、従来の培養方法で得られる孢子嚢数よりも遥かに多い。

【0038】取得した菌体及び孢子嚢は、それらを懸濁した緩衝液のまま、コガネムシ科昆虫の防除剤として用いてもよく、あるいは乾燥して粉末にして用いても良い。また乾燥した後、水あるいは緩衝液の懸濁液として

使用しても良い。更にこれらの孢子嚢は農薬に用いられる公知慣用の賦形剤、担体、栄養剤等の成分と混合して使用することもできる。また本発明の孢子と他の微生物製剤を混合して使用することも可能である。

【0039】本発明のバチルス・ポピリエの孢子嚢を有効成分とするコガネムシ科昆虫の防除剤は、芝や農作物の害虫としてよく知られているコガネムシ科昆虫のドウガネブイブイ (*Anomala cuprea*)、セマダラコガネ (*Blitopertha orientalis*)、マメコガネ (*Popillia japonica*)、ウスチャコガネ (*phyllopertha diversa*)、チャイロコガネ (*Adoretus tenuimaculatus*)、ヒメコガネ (*Anomala rufocuprea*) 等に対して、いずれも優れた殺虫性、防除効果を示し、中でも比較的大型なコガネムシであるドウガネブイブイやセマダラコガネの幼虫に対して優れた殺虫、防除効果を示す。

【0040】

【実施例】以下、実施例及び試験例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【0041】(実施例1) (培地の製造)

300ml容量の三角フラスコ2本それぞれに蒸留水100mlを入れ、トリプトン0.5重量% (DIFCO社製)、イーストエキストラクト1.5重量% (オキゾイド社製)、リン酸水素ナトリウム0.3重量% (和光純薬社製特級)、寒天2.0重量% (和光純薬社製特級) を添加し混合した。(以下、これら培地成分を含有する培地を培地Aと称する。)

【0042】培地Aに和光純薬社製特級粉末活性炭を、無添加、0.1重量%及び1.0重量%となるように加えた。その後121℃、20分のオートクレーブ殺菌を行い寒天が固化しないうちに十分攪拌して、直径9cmのプラスチックシャーレにて20ml添加して平板培地を作成した。活性炭含有量が異なるそれら平板培地を用いて、バチルス・ポピリエ・セマダラ株及びバチルス・ポピリエ・デュトキ (ATCC 14706) 株を培養した。

【0043】セマダラ株 (FERM P-16818) は、乳化病コガネムシ感染幼虫から採取した体液中の孢子嚢を用いた。孢子嚢数を孢子顕微鏡による直接検鏡法により計測し  $1 \times 10^4$  個/ml となるように調製しエ

ッペンチューブに0.5ml取り、ヒートブロックにて70℃、20分の加熱処理後、そのうちの50μlを上記で調製した平板培地に塗布した。

【0044】デュトキ株は凍結乾燥保存されていた菌体 (孢子及び孢子嚢は含まず) を、DIFCO社製トリプトン0.5重量%、オキゾイド社製イーストエキストラクト1.5重量%、和光純薬社製特級リン酸水素ナトリウム0.3重量%、和光純薬社製特級粉末活性炭0.1重量%を添加して121℃で20分の殺菌処理した液体培地を用いて、30℃のインキュベータ内にて120rpmの攪拌条件により1週間培養した。その培養液の0.1mlを無菌的に寒天培地に塗布した。以上の菌体を塗布した平板培地を30℃のインキュベータ内にて14日間培養した。

【0045】培養終了後、シャーレに無菌的に蒸留水2mlを添加して発生したコロニーを懸濁させた後、菌体及び孢子嚢を取得した。取得した溶液中の単位容積当たりの孢子嚢数、及び全菌数を顕微鏡による直接検鏡により計測し、式1により孢子嚢化率を算出した。表1にセマダラ株を用いた場合の試験結果を示す。活性炭添加濃度が0.1重量%の場合においてのみ孢子嚢が形成した。

【0046】

【式1】

孢子嚢化率 (%) = (孢子嚢数) / (全菌数) × 100

【0047】活性炭添加濃度が0.1重量%の場合に得られたセマダラ株の孢子嚢の顕微鏡写真を図2に示す。顕微鏡写真は株式会社ニコン製の光学顕微鏡ECLIPSE E600に株式会社ソニーのカラービデオカメラモジュールXC-003を接続して撮影した (倍率: ×3800)。孢子嚢中に1つの孢子と1つのバラスポラルポディとが含まれることが判る。

【0048】表2にデュトキ株を用いた場合の試験結果を示した。同様に活性炭添加濃度が0.1重量%の場合においてのみ孢子嚢が形成した。表1にセマダラ株による孢子嚢の形成を、表2にデュトキ株による孢子嚢の形成状況を示した。

【0049】

【表1】

培地中の活性炭濃度	0%	0.1%	1.0%
孢子嚢化率	0%	4.8%	0%

【0050】

【表2】

培地中の活性炭濃度	0%	0.1%	1.0%
孢子嚢化率	0%	3.1%	0%

【0051】（実施例2）培地中の活性炭量の検討を行った。300ml容量の三角フラスコ7本それぞれに培地Aの成分を添加し、そこに和光純薬社製特級粉末活性炭を、無添加、0.05重量%、0.1重量%、0.25重量%、0.5重量%、1.0重量%、2.0重量%含むように調製した。その後121℃、20分のオートクレーブ殺菌を行い実施例1と同様に平板培地を作成した。

【0052】セマダラ株は実施例1において活性炭添加濃度0.1重量%にて培養し取得した孢子囊を含む菌体を使用した。取得液を無菌的に蒸留水にて希釈して $1 \times 10^5$ 個/mlとなるように調製した。その液をエッペンチューブに0.5ml取り、ヒートブロックにて70℃、20分の加熱処理後、50 $\mu$ lを取り上記で調製した活性炭添加量の異なる平板培地にそれぞれ塗布した。菌体を塗布した上記の平板培地を30℃のインキュベーター内にて14日間培養した。

【0053】培養終了後、シャーレに無菌的に蒸留水2mlを添加して発生したコロニーを懸濁させた後、孢子囊及び菌体を取得した。取得した溶液中の単位容積当たりの孢子囊数及び全菌数を顕微鏡による直接接鏡により計測し、式1により孢子囊化率を算出した。図3に培地中の活性炭濃度と孢子囊化率の関係を示す。縦軸は孢子囊化率(%)を、横軸は培地中の活性炭濃度(重量%)を表す。活性炭濃度が0.5重量%以下で良好な孢子囊形成が見られる。

【0054】（実施例3）培地中のグルコース濃度が孢子囊形成に与える影響を検討した。培地Aの活性炭濃度が0.1重量%となるように調製したものと、培地Aにグルコース濃度が0.2重量%、活性炭濃度が0.1重量%含まれるように調製した平板培地を作成した（以下、それぞれ平板培地P、平板培地Qと称す）。

【0055】また培地Aの成分中のトリプトン及びイーストエキストラクト濃度をそれぞれ2倍にした培地に活性炭濃度が0.1重量%となるように調製し平板を作成した（以下、平板培地Rと称す）。

【0056】更に培地成分をDIFCO社製トリプトン1.0重量%、オキシド社製イーストエキストラクト0.6重量%、和光純薬社製特級リン酸水素ナトリウム0.3重量%、和光純薬社製特級寒天1.5重量%、和光純薬社製特級溶性デンプン1.0重量%、和光純薬製特級グルコース0.1重量%、和光純薬製特級フラクトース0.1重量%、和光純薬製特級シュクロース0.1重量%、和光純薬製特級マルトース0.1重量%、和光純薬製特級マンノース0.1重量%、和光純薬製特級サリシン0.1重量%として和光純薬社製特級粉末活性炭を0.6重量%とした平板培地（平板培地Sと称す）を作成した。

【0057】それら培地中のグルコース濃度を比較するために培地成分A中に含まれるグルコース濃度を測定した。培地A成分から寒天を除いた溶液を調製し、ペーリンガー・マンハイム社のFキットを用いて酵素法によりグルコース濃度を測定した。この結果得られたグルコース濃度は38mg/l（0.0038重量%）であった。

【0058】以上により各平板培地中のグルコース濃度は、平板培地Pが0.0038重量%、平板培地Qが0.2重量%、平板培地Rが0.0076重量%、平板培地Sが0.1重量%である。尚、平板培地Rについてはトリプトン・イーストエキストラクトの濃度が2倍であることから、平板Pの測定値を2倍した。また平板培地QとRについてはそれぞれグルコースが添加されているので、存在するグルコース濃度は添加グルコース濃度に等しい。

【0059】上記の4種類の平板培地にてバチルス・ポピリエ・セマダラ株を培養した。用いた培養方法は実施例1と同様である。また実施例1と同様の方法により、孢子囊化率を算出した。表3に培地中のグルコース濃度と孢子囊化率とを示す。グルコース濃度0.01重量%以下の場合に孢子囊化率が良好であることがわかる。

【0060】

【表3】

	平板 培地P	平板 培地Q	平板 培地R	平板 培地S
培地中のグルコース濃度 (重量%)	0.0038	0.1	0.0076	0.1
培地中の活性炭濃度 (重量%)	0.1	0.1	0.1	0.6
孢子囊化率(%)	5.80	0	0.04	0

【0061】（実施例4）本発明の製造方法により得られた孢子囊によるコガネムシ科昆虫の殺虫試験を行った。直径6cmのプラスチックカップ10個に腐葉土20gずつを入れた。そのうちの5個には、孢子囊数が1

$\times 10^8$ 個/カップとなるよう孢子囊を散布した。散布した孢子囊は実施例3に示した平板Pと同様の組成の平板を作成し、同じ条件にて培養して取得した孢子囊を使用した。

【0062】残りの5個はコントロールとして、孢子囊無添加で試験した。それぞれのカップにセマダラコガネ3令幼虫を1頭ずつ入れ、25℃のインキュベータ内で40日間飼育し、死亡個体数を調べると共に死亡体内に乳化病孢子が形成されているかを顕微鏡で調べた。

【0063】表4にセマダラコガネに対する昆虫体外形

	死亡率%		
	10日目	20日目	30日目
孢子囊無添加カップ	0	0	0
孢子囊添加カップ	40%	80%	100%

【0065】（実施例5）実施例4と同様にして調製したカップを3個ずつ用意した。そこにドウガネブイブイ2令幼虫を1頭ずつ入れ25℃のインキュベータ内で40日間飼育し、死亡個体数を調べると共に死亡体内に乳化病孢子が形成されているかを顕微鏡で調べた。本発明の製造方法により製造した孢子囊のドウガネブイブイに

成孢子囊の殺虫活性の結果を示す。30日目までに全ての幼虫が死亡し、死亡した幼虫5頭の内、2頭が体内に乳化病の孢子囊を形成していた。

【0064】

【表4】

に対する殺虫活性試験の結果を表5に示した。30日目までに67%の幼虫が死亡し、死亡した幼虫2頭のうち1頭が体内に乳化病の孢子囊を形成していた。

【0066】

【表5】

	死亡率%		
	10日目	20日目	30日目
孢子囊無添加カップ	0	0	0
孢子囊添加カップ	0	33%	67%

【0067】

【発明の効果】本発明は、コガネムシ科昆虫の幼虫を用いることなく、人工培地を用いて孢子とバラスポラルボディを含む多量のバチルス・ポピリエの孢子囊を短期間で得るバチルス・ポピリエ孢子囊の工業的な製造方法、該孢子囊を有効成分とする芝や農園芸作物や樹木等の根に多大な被害を与えるコガネムシ科昆虫の優れた防除剤、及び防除方法を提供することができる。

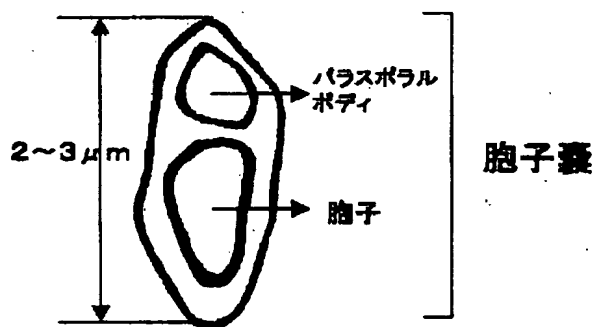
【図面の簡単な説明】

【図1】 孢子とバラスポラルボディを含むバチルス・ポピリエの孢子囊の模式図である。

【図2】 実施例1で、活性炭添加濃度が0.1重量%の場合に得られたセマダラ株の孢子囊の顕微鏡写真である。

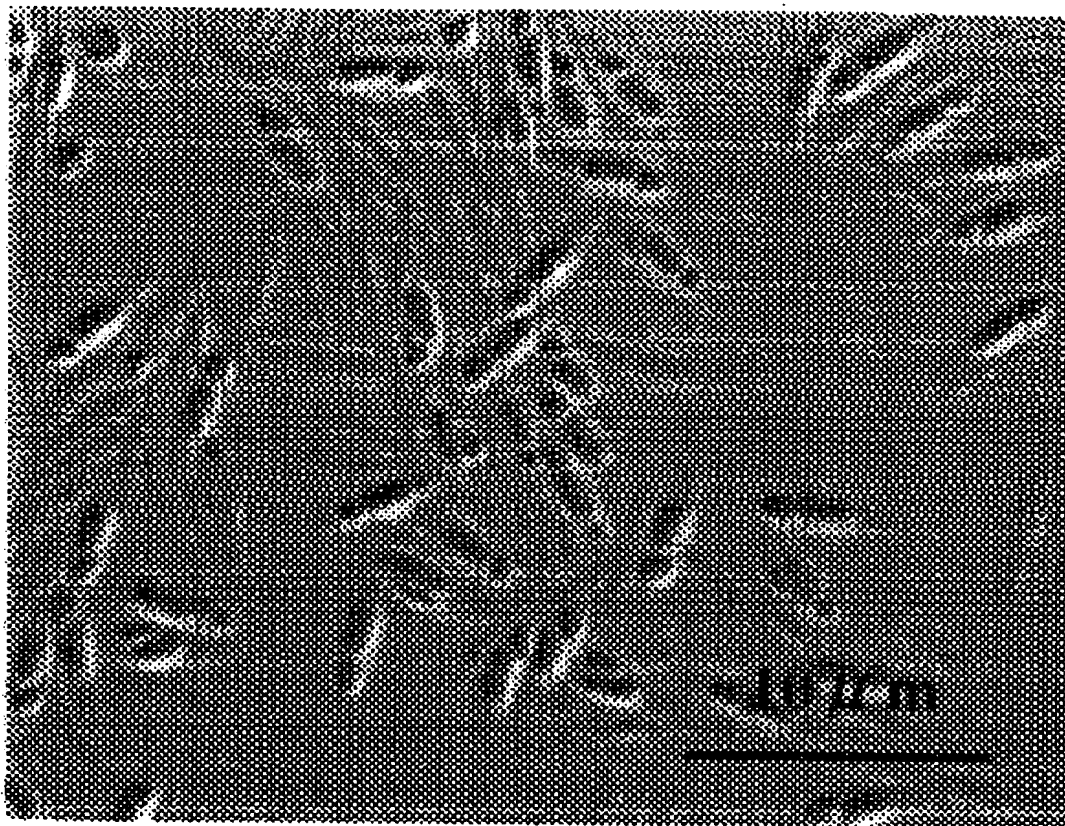
【図3】 培地中の活性炭濃度と孢子囊化率の関係を示す図である。縦軸は孢子囊化率(%)、横軸は培地中の活性炭濃度(重量%)を表す。

【図1】



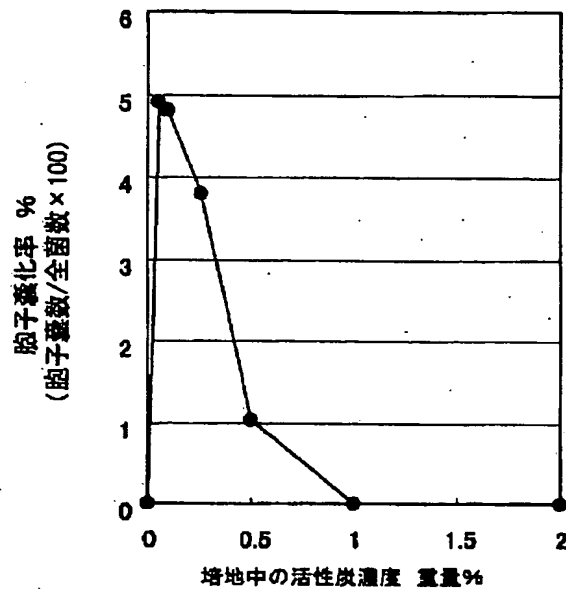


【図2】



× 3900

【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テマコード (参考)

// (C 1 2 N 1/20

(C 1 2 N 1/20

C 1 2 R 1:07)

C 1 2 R 1:07)

(72) 発明者 西橋 秀治

(72) 発明者 田中 正男

千葉県佐倉市大崎台 2-23-9

千葉県千葉市美浜区高浜 6-11-12

(72) 発明者 藤家 梓

(72) 発明者 横山 とも子

千葉県長尾郡睦沢町上市場 256-3

千葉県千葉市美浜区磯部 5-16-1-501

(72) 発明者 長谷川 誠

Fターム (参考) 4B065 AA15X BB02 BB15 BB23

千葉県千葉市緑区椎名崎町 486-E-503

BB26 BB29 BC13 BC41 CA48

CA60

4H011 AC01 BB21 DC11

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**